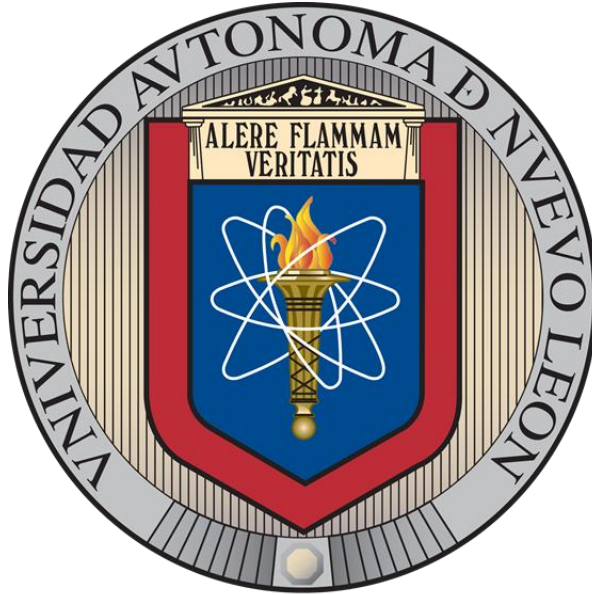


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA SUCEPTIBILIDAD A LOS INSECTICIDAS PERMETRINA
Y DELTAMETRINA, EN *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) MEDIANTE LA
MODIFICACIÓN DEL MICROBIOMA

Por

ARMANDO JAVIER JIMENEZ CAMACHO

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
acentuación en Entomología Médica.

Agosto, 2021

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL INSECTICIDA
PERMETRINA EN *Aedes aegypti* MEDIANTE LA
MODIFICACIÓN DEL MICROBIOMA.

Comité de Tesis:

Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Presidente

Dra. Mayra A. Gómez Govea
Secretario

Dr. Gustavo Ponce García

Vocal 1

Dra. Adriana Elizabeth Flores Suarez.

Vocal 2

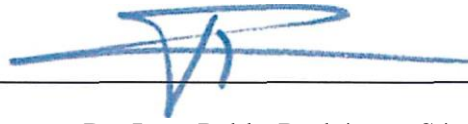
Dr. Eduardo A. Robolfar Tellez

Vocal 3

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de posgrado



EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA AL INSECTICIDA
PERMETRINA EN *Aedes aegypti* MEDIANTE LA
MODIFICACIÓN DEL MICROBIOMA.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'R' followed by a vertical line and a horizontal stroke.

Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Dr. Gustavo Ponce García y la Dra. Adriana Elizabeth Flores Suarez por la confianza brindada para la realización de esta investigación. En especial a la Doctora Mayra A. Gómez Govea, Dr. Eduardo A. Robollar Tellez y la Dra. Margarita De La Luz Martínez-Fierro por su apoyo, paciencia, asesoramiento y en la realización de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Mosquitos-Vectores.....	5
2.2 Resistencia a insecticidas	6
2.3 Microbiota en insectos.....	7
2.4 Microbiota intestinal de <i>Ae. Aegypti</i>	8
2.5 Técnicas genómicas.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS	14
5.1 General	14
5.2 Especificos	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Material Biológico	15
6.2 Insecticidas	15
6.3 Antibióticos	15
6.4 Tratamiento con antibióticos	15
6.5 Bioensayos.....	16
6.6 Extracción de ADN	16
6.7 Preparación dirigida de la biblioteca	17
6.8 Secuenciación	17
6.9 Análisis de datos	17
7. RESULTADOS	19
7.1 Bioensayos de modificación de microbiota y exposición a los insecticidas de <i>Ae. aegypti</i>	19
7. 2 Comunidades microbianas de <i>Ae. aegypti</i>	19
7.3 Supresión de la microbiota de <i>Ae. Aegypti</i>	21
7.4 Exposición a permetrina	22
7.5 Exposición a deltametrina	25
8. DISCUSIÓN.....	28
9. CONCLUSIÓN	34
10. REFERENCIAS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Abundancia taxonómica después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en *Ae. aegypti*..... 17

Tabla 2. Abundancia a nivel especie después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en mosquitos tratados con antibióticos. 19

Tabla 3. Abundancia a nivel especie después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en mosquitos tratados con antibiótico.....
21.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de supervivencia en una población de adultos de <i>Ae. aegypti</i> utilizando Bioensayo de botellas del CDC (* diferencia entre tratamientos = $P < 0.05$)..	
.....	14
Figura 2. Abundancia taxonómica de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> alimentados con sacarosa (grupo control).....	15

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
µg/mL	microgramo por mililitro
µL	microlitros
µm	micras
mg	miligramos
h	horas
U	unidades
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIT	Técnica del macho estéril
NGS	Secuenciación de nueva generación
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
ARISA	Análisis Automatizado del Espaciador Intergénico Ribosómico
16S rRNA	Acido ribonucleico ribosomal 16S
%	porcentaje
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
DD	Dosis diagnóstico
TD	Tiempo diagnóstico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RESUMEN

Aedes aegypti es el mosquito transmisor de enfermedades virales como el dengue, chikungunya, zika y fiebre amarilla. Los mosquitos tienen una variedad de microorganismos que cumplen con diversas funciones. Estudios han sugerido la importancia del microbioma para la digestión de nutrientes, el metabolismo, la producción de huevos, el desarrollo y la respuesta inmune. Sin embargo, la importancia fisiológica de estas bacterias en la resistencia a los insecticidas no se ha establecido. El objetivo del estudio fue evaluar si la susceptibilidad al insecticida permetrina y deltametrina se altera modificando el microbioma en *Ae. aegypti* usando antibióticos (penicilina-estreptomicina y gentamicina). Los mosquitos adultos se alimentaron con una solución de sacarosa al 10% mezclada con antibióticos, para después, ser expuestos a la dosis diagnóstica de permetrina y deltametrina. Los mosquitos sobrevivientes a la dosis diagnóstica fueron colectados para la extracción de ADN total y se secuenció el gen bacteriano del ARN ribosomal 16S en Illumina® MiSeq™. Se encontró a nivel filum a Proteobacteria (92,4%) y Bacteroidetes (7,6%) como residente natural en *Ae. aegypti*. Cuando se modificó la microbiota, se observó una disminución en la supervivencia cuando se expusieron a permetrina y un aumento cuando se expuso a deltametrina. Las especies más abundantes fueron *Pantoea agglomerans* (38,40%) y *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* (14,20%) con permetrina, y *Elizabethkingia meningoseptica* (38,4%), *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* (26,1%) cuando se exponen a la deltametrina siendo un comienzo para el desarrollo de nuevas estrategias de control de vectores.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector that transmits viral diseases such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever. Mosquito species have a variety of microorganisms that fulfill various functions. Several studies have suggested the importance of the microbiome for nutrient digestion, metabolism, egg production, development and immune response. However, the physiological importance of these bacteria in resistance to insecticides has not yet been established. The objective of the study was to evaluate the susceptibility to permethrin and deltamethrin insecticide, modifying its microbiome by antibiotics in *Ae. aegypti*. The adult mosquitoes were fed with a solution of sucrose mixed with antibiotics, and then were exposed to the diagnostic dose of permethrin and deltamethrin. The surviving mosquitoes were collected for total DNA extraction and the 16S ribosomal RNA bacterial gene was sequenced in Illumina® MiSeq™. Proteobacteria (92.4%) and Bacteroidetes (7.6%) were found at filum level as a natural resident in *Ae. aegypti*. When the microbiota was modified, a decrease in survival was observed when exposed to permethrin and an increase when exposed to deltamethrin. The most abundant species were *Pantoea agglomerans* (38.40%) and *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* (14.20%) with permethrin, and *Elizabethkingia meningoseptica* (38.4%), *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* (26.1%) when exposed to deltamethrin being a start for the development of new vector control strategies.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por insectos vectores se han convertido en preocupación de la salud mundial. La incidencia y prevalencia de dichas enfermedades ha ido en aumento en las últimas décadas; esto como resultado de la expansión del alcance geográfico de los insectos vectores, el transporte mundial, la urbanización no planificada y el cambio climático (Jupatanakul *et al.* 2011).

Los virus dengue, zika, fiebre amarilla y chikungunya, son los arbovirus más importantes causantes de enfermedades emergentes a nivel mundial. Estos virus son transmitidos por *Aedes aegypti* y *Aedes. albopictus*. Aunque se han realizado avances hacia el desarrollo de una vacuna, no hay cura para dichas enfermedades (Villamil-Gómez *et al.* 2016). La mayoría de los programas de control de estos vectores dependen de gran medida de la aplicación de insecticidas químicos (Musso y Gubler, 2015). Sin embargo, existe la preocupación sobre el impacto ambiental de este enfoque, así como el rápido desarrollo de resistencia por parte de los mosquitos (Nkya *et al.* 2013). Estos problemas han creado la necesidad del desarrollo de métodos para el control de la transmisión de estos virus (Ramírez *et al.* 2012).

Un microbioma es un área de vida microbiana, la cual es la suma de los todos los genomas de microorganismos que viven dentro de un ecosistema (Weiss y Aksoy, 2011). Los insectos albergan microorganismos que colonizan y crecen dentro de sus tejidos, principalmente en el sistema digestivo. Estos microorganismos están implicados en diversos procesos fisiológicos, incluidos la digestión de los alimentos, la nutrición, la fijación del nitrógeno y reproducción (de O Gaio *et al.* 2011). Los resultados de estas nuevas investigaciones han ayudado a la mejor comprensión del papel que desempeñan comunidades dentro de su ecosistema (Weiss y Aksoy, 2011). La caracterización de la estructura de la comunidad microbiana permitirá comprender la función que desempeñan dentro de un ecosistema (Wang *et al.* 2011). Existen estudios que han evaluado la microbiota de *Ae. aegypti*, sin embargo, poco se sabe de la función que estos desempeñan

en la exposición a los insecticidas. Es por ello que el presente proyecto evaluó el papel del microbioma de *Ae. aegypti* en la exposición a insecticidas permetrina y deltametrina.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mosquitos-Vectores

Aedes aegypti es considerado vector potencial de los virus que producen enfermedades tales como el dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika (Smith et al. 2016). *Ae. aegypti* es una especie altamente domesticada que se ha adaptado al entorno urbano (Rodríguez et al. 1999). Este mosquito es principalmente encontrado en las regiones tropicales y sub-tropicales de América del sur, África y el sur de Asia pero ahora ha incrementado dramáticamente su asentamiento en áreas más templadas (Kantor, 2016). *Aedes aegypti* es un mosquito que se cría en recipientes. Las hembras grávidas prefieren depositar sus huevos por encima del nivel del agua en las firmes paredes de los recipientes (Rodríguez Cruz, 2002).

En la actualidad ha habido un aumento en la incidencia de dengue, zika, fiebre amarilla y chikungunya en todo el mundo. Esto se ha asociado al aumento de la frecuencia de la actividad epidémica y la expansión de la distribución tanto el mosquito vector. Cada año se calcula que a nivel mundial ocurren entre 40 y 50 millones de casos de enfermedades arbovirales . Los aumentos en la distribución y en la intensidad de la transmisión se ven agravados por la falta de antivirales o vacunas comercialmente disponibles para cualquiera de las enfermedades (Birmingham, 2015).

La prevención y el control de las enfermedades producidas por los flavivirus dependen básicamente del vector. Existen dos estrategias usadas comúnmente. La estrategia de erradicación que implica cobertura universal de todos los criaderos del mosquito en todas las casas de todas las localidades infestadas en el país, para la eliminación total del vector y la subsecuente vigilancia permanente contra la reinfestación (Rodríguez Cruz, 2002). El costo inicial de esta estrategia es alto, pero una vez eliminado el mosquito, el costo de vigilancia contra la reinfestación es mucho menor y se evita totalmente la transmisión de todas las enfermedades que trasmite el vector. La estrategia de control integrado tiene como base evitar epidemias y muertes. Se identifican las áreas

con mayor riesgo y se concentran los esfuerzos en estas áreas para reducir, pero no para erradicar el vector. El costo de la estrategia de control es menor que el costo de la fase de ataque de la estrategia de erradicación, pero mayor que la fase de mantenimiento de la estrategia de erradicación (Rodríguez Cruz, 2002). Después de algunos años de ejecución de esta estrategia, el costo de control podría ser mayor que el costo de la erradicación. En México, el control de estos mosquitos depende del uso de insecticidas, sin embargo, como en muchos otros países, la efectividad de programas de control de vectores se ve comprometido por el desarrollo a resistencia a los insecticidas (Ponce García, 2016).

2.2 Resistencia a insecticidas

La aplicación de insecticidas es una de las medidas de control más importante hacia este vector y los piretroides son el grupo químico más empleado para reducir sus poblaciones (Marriel et al. 2016). El control de *Ae. aegypti* se basa actualmente en el manejo del hábitat (para reducir los criaderos de larvas) y el uso de insecticidas (Smith et al. 2016). Desde los años 50s en México, el programa de control de vectores ha dependido del uso de una serie de insecticidas, sin embargo, como en muchos otros países, la efectividad de dichos programas ha visto comprometido por el desarrollo de resistencia a los insecticidas (Ponce-García, 2016).

La lista de insecticidas seguros y rentables se ha reducido significativamente en los últimos años por diversas restricciones además de la resistencia, como la falta de apoyo para investigación en el desarrollo de nuevas moléculas, los largos procesos y costos de registro (Zaim y Gillet, 2002). Por tal motivo, los programas de control hoy día se encuentran en la búsqueda de nuevas estrategias y/o herramientas que aseguren un mejor manejo de la resistencia (Ranson y Lissenden, 2016). Entre estas, se encuentran la rotación de insecticidas, el uso de mezclas (OMS, 2012), aceites esenciales (Fujiwara et al. 2017) y extractos vegetales; el desarrollo herramientas innovadoras como la paratransgénesis (la manipulación de simbiosis para la producción de moléculas efectoras anti-patógeno) el uso de mosquitos genéticamente modificados técnica del macho estéril (SIT), (Araujo et al. 2015) y el desarrollo de vacunas (WHO, 2016). La

caracterización molecular y bioquímica es otra herramienta importante en el desarrollo de marcadores para el monitoreo de la resistencia, así como el modelado molecular de los sitios receptores de piretroides en el canal de sodio (Dong et al. 2014).

La sostenibilidad del control de vectores con insecticidas enfrenta dos limitaciones importantes. Primero está el desarrollo de la resistencia. En segundo lugar, se encuentra el número limitado de nuevos insecticidas que se comercializan para el control de vectores. Como consecuencia, en la actualidad quedan pocos insecticidas disponibles para el control de vectores (Smith et al. 2016). Los piretroides son los insecticidas que se utilizan ampliamente para el control de *A. aegypti* y *A. albopictus* adultos. Algunos de los más utilizados son la permetrina, deltametrina, cipermetrina y ciflutrina para tratamientos de pulverización residual y espacial, normalmente en anticipación o durante una epidemia (Liu et al. 2006).

La resistencia puede deberse a uno o a la suma de varios mecanismos, siendo la alteración del sitio blanco y la actividad enzimática elevada los mecanismos más frecuentes (Lol et al. 2013). Además, existen factores ambientales que pueden ser clave en la resistencia tales como la presencia de contaminantes, las interacciones bióticas entre los mosquitos y su microbioma (Nkya et al. 2013).

Se han identificado dos mecanismos principales de resistencia a los piretroides en los mosquitos *Aedes*: mayor desintoxicación a través de las monooxigenasas del citocromo P450 y mutaciones en Vssc (es decir, resistencia a la caída o kdr). Ambos mecanismos pueden estar presentes, pero la importancia relativa de cada mecanismo en diferentes poblaciones parece variar (Saavedra-Rodriguez et al. 2015). Dado a la gran variedad de mecanismos de resistencia que ha desarrollado *Ae. aegypti* a piretroides, es importante el entendimiento de la fisiología del mosquito para la búsqueda de nuevas estrategias para el control de sus poblaciones.

2.3 Microbiomas en insectos

Los insectos son el grupo de animales más exitoso, tanto en términos de diversidad como de supervivencia en varios nichos ecológicos. Se estima que el intestino de los insectos contiene 10 veces más microorganismos que las células totales y 100 veces más genes microbianos que los genes animales (Krishnan M. et al. 2014). Se conoce que, algunos microorganismos han co-evolucionado y desarrollado una relación simbiótica con los insectos (Dennison, N. J., 2014) a pesar de ello la complejidad y diversidad de las asociaciones es baja a comparación con los hospedadores eucariotas superiores (Weiss B. y Aksoy S., 2011).

De los primeros estudios de simbiosis en insectos han descrito que el papel de estos va relacionado con la nutrición, incluida la suplementación dietética, la tolerancia a las perturbaciones ambientales y el mantenimiento y / o mejora del homeostasis del sistema inmunitario del hospedador (Weiss y Aksoy, 2011; Ricci et al. 2012). Otros estudios también sugieren la importancia de la microbiota de los insectos en la activación y mantenimiento de su sistema inmune basal actividad y cebado inmune (Dennison, 2014). Existen diversos factores que influyen en el establecimiento de la microbiota en el intestino de los insectos entre ellos se encuentra la dieta, el pH, la especificidad del huésped la etapa de la vida y el entorno del huésped. (Colman, 2012).

Estudios realizados previamente en la clase Insecta han determinado el papel de la microbiota en diferentes especies, como *Drosophila*, en la que la microbiota participa en el desarrollo, la función hormonal, la inmunidad innata y la expresión génica (Douglas 2011; 2014). Investigaciones recientes han resaltado la importancia del microbioma en funciones específicas en los insectos como lo observado en las hormigas *Tetraponera*, los cuales participan en la fijación del nitrógeno, en el metabolismo de la lignocelulosa en termitas y en áfidos en el control de la reproducción por parte *Buchnera* sp. (Douglas, 2009, Colman, 2012). En *Hymenoptera* son pocos los estudios basados en intestino bacteriano, solo existen investigaciones sobre *Apis mellifera* donde encontraron

Snodgrassella alvi, *Gilliamella apicola*, *Acetobacteraceae* y *Lactobacillus* (Corby-Harris et al. 2014). Otro ejemplo, la bacteria facultativa *Hamiltonella* hace que los áfidos fitófagos sean más resistentes a los parásitos avispas, mientras que el simbionte primario *Buchnera aphidicola* proporciona aminoácidos esenciales (Douglas, 1998). La bacteria *Wigglesworthia glossinidi* se cree que proporciona vitaminas a la mosca tsetse hematófago, un importante vector de la tripanosomiasis africana o la enfermedad del sueño, y los beneficios fuentes de carbono y la protección contra el insecto anfitrión (Akaman et al. 2002).

2.4 Microbiota intestinal de *Ae. aegypti*

La composición de la microbiota intestinal del mosquito puede variar dependiendo de factores como la especie, el sexo y la etapa de vida del mosquito, su origen geográfico comportamiento de alimentación. El ciclo de vida del mosquito consiste en etapas de larvas y pupas acuáticas y una etapa de adultos terrestres. Debido a esto, los hábitats son completamente diferentes durante su ciclo de vida, es por ello que el microbioma del mosquito puede ser distinto (Jupatanakul, y Dimopoulos, 2014; Wang, 2015). El contenido intestinal de los mosquitos generalmente se limpia cuando el insecto sufre metamorfosis y muda durante las transiciones de larvas a pupas y pupas a adultos y así pudiendo ser repoblado con nuevas bacterias (Moll et al. 2001). Estudios recientes describen que los mosquitos adquieren las bacterias durante las etapas de larvas a partir de los hábitats acuáticos en el que se desarrollan y los adultos lo pueden adquirir de su régimen dietético a partir del néctar o sangre (Coon et al. 2016).

La microbiota del mosquito se ha encontrado que tiene un papel muy importante en la fisiología; en la nutrición, se ha observado que bacterias como *Enterobacter sp.* y *Serratia sp.* participan en procesos de digestión y al ser eliminadas estas bacterias atrasa procesos digestivos (de O Gaio, 2019). De la misma manera, se sabe que la microbiota puede influenciar la reproducción modulando comportamiento de apareamiento de mosquitos, preoviposición y reproducción, además se sabe que en *Cx. pipiens* bacterias como *Klebsiella sp.* y *Aeromonas sp.*, potencian la oviposición (de O Gaio, 2019).

En el caso de los mosquitos del genero *Aedes*, se ha descrito que en el intestino medio de la especie *Aedes triseriatus* en condiciones de laboratorio, contiene la presencia de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobactériaceae como *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., y *Serratia* sp. Recientemente, se ha demostrado que las poblaciones silvestres de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* abrigan principalmente Proteobacteria y Firmicutes, incluyendo los géneros *Acinetobacter* sp., *Asaia* sp., *Delftia* sp., *Pseudomonas* sp., *Wolbachia* sp., y *Bacillus* sp., así como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Existen varios estudios en donde caracterizan la microbiota en *Ae. aegypti* de áreas endémicas de Panamá se observó los phylums mas predominantes fueron Proteobacteria y Firmicutes. De manera similar, se aislaron mosquitos *Ae. aegypti* (Rockefeller) del género *Bacillus*, *Elizabethkingia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* y *Sphingomonas* (Gusmão et al. 2010). Pocos estudios han tratado de vincular las infecciones patógenas con alteraciones en la composición del microbioma del insecto-vector. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado el papel de la microbiota como modulador de la competencia del vector en Anopheles durante la infección por Plasmodium (Dennison et al. 2014; Abdul-Ghani et al. 2012). En *Aedes atropalpus*, se ha determinado la microbiota intestinal y se ha asociado con variaciones en la supervivencia, el tamaño y la producción de huevos (Coon et al. 2016).

Recientemente han sido propuestas nuevas estrategias de control basadas en la manipulación organismos simbios. Un ejemplo de esto en acción es el uso de la bacteria endo simbiote *Wolbachia*. (Iturbe-Ormaetxe, 2011). Esta bacteria tiene un impacto en el desarrollo de algunas especies de mosquitos ya que acorta la vida de los insectos y tiene efectos indirectos en la replicación y diseminación de patógenos que afectan a la capacidad de transmisión vectorial (McMeniman, 2009). La complejidad de la microbiota difiere mucho entre especies de insectos y entre individuos. Sin embargo, el beneficio de esta se ve reflejado en funciones fisiológicas como la mejora de la nutrición en dietas pobres en nutrientes, en la digestión y la desintoxicación de compuestos nocivos, en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune a través de la promoción del desarrollo y el acondicionamiento del huésped y sus sistemas

reproductores dentro de los insectos y esta va depender de la dieta, ubicación y estilo de vida del insecto anfitrión (Engel y Moran, 2013).

2.5 Técnicas genómicas

Las herramientas moleculares utilizadas para el análisis e identificación de la comunidad microbiana han experimentado un rápido desarrollo en las últimas dos décadas. Las técnicas moleculares modernas proporcionan una visión de la biodiversidad microbiana contenida en insectos (Meyer y Kircher, 2010). Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ofrecen formas novedosas y rápidas para caracterización de todo el genoma y perfiles de ARNm, ARN pequeños, regiones de factores de transcripción, estructura de patrones de metilación de cromatina y ADN, microbiología y metagenómica (Ansorge, 2009). Se han utilizado previamente varias técnicas para el estudio de comunidades microbianas tales como la técnica de fingerprinting y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y Análisis Automatizado del Espaciador Intergénico Ribosómico (ARISA) (Brodie *et al.* 2006). En la actualidad, la secuenciación del gen 16S rRNA se ha empleado en una variedad de estudios enfocados en la evaluación de la diversidad y las relaciones filogenéticas de los microbios intestinales demostrándose ser una herramienta poderosa para comprender los factores que dan forma a las comunidades microbianas, tanto por su potencial informativo como predictivo. Los enfoques de metagenómica tienen un gran potencial para abordar aspectos funcionales de la microbiota intestinal aviar, particularmente para la comparación entre huéspedes con diferentes características dietéticas, fisiológicas y de historia de vida. Las técnicas de secuenciación masivas son una poderosa herramienta para la caracterización de la diversidad microbiana intestinal, ya que evita la necesidad de cultivar (Tringe *et al.* 2005). Estudios basados en la secuenciación de ADN pueden proporcionar perfiles taxonómicos completos de las diferentes especies que forman unidades ecológicas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades como dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika son hoy en día un problema de salud pública. El control de estas enfermedades únicamente es a través del control del vector ya que no existe una vacuna para la mayoría de estas enfermedades. Los sistemas de control se basan principalmente en la colocación periódica de insecticidas residuales como tratamientos focales en hábitats de larvas, sin embargo, a pesar de las medidas de control la tendencia epidemiológica de estas enfermedades es más frecuente. El impacto de estas enfermedades en la salud pública y su rápida propagación global trae como consecuencia altos costos hacia el sector salud y las epidemias ocasionan un impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de los países. Debido a que estas enfermedades sólo pueden persistir donde sus vectores (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*) estén presentes, es necesario la búsqueda de nuevas estrategias para el manejo y control de estos. Aunque la información sobre la naturaleza de las bacterias asociadas a los mosquitos está aumentando, sus funciones y potencial todavía no se han explorado. Esto se debe en parte a la complejidad de las interacciones en términos de población bacteriana dinámica influenciada por diferentes factores bióticos y abióticos. La aplicación de la secuenciación de nueva generación debe mejorar nuestro conocimiento de los patrones microbianos y sus funciones en la biología de los mosquitos. El análisis de esta investigación permitirá una mejor comprensión de la dinámica y función del microbioma asociado a mosquitos y su respuesta a los insecticidas.

4. HIPÓTESIS

El microbioma de poblaciones de *Ae. aegypti* aumenta la supervivencia de las poblaciones expuestas a insecticidas permetrina y deltametrina.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la susceptibilidad a los insecticida permetrina y deltametrina, mediante la modificación del microbioma por antibióticos en poblaciones de *Ae. aegypti*.

5.2 Específicos

1. Caracterizar el microbioma en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* .
2. Determinar el porcentaje de mortalidad en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* y con modificación de microbioma mediante la adición de antibióticos, por exposición a dosis diagnóstico de permetrina y deltametrina
3. Determinación del microbioma en individuos supervivientes a dosis diagnóstico de los insecticidas piretroides.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

El estudio se realizó utilizando colecciones de *Ae. aegypti* de la localidad San Lorenzo con antecedentes de resistencia, correspondiente al municipio de Umán en el estado de Yucatán, las cuales fueron mantenidas en condiciones de insectario (temperatura media $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $75\% \pm 5\%$, con un fotoperiodo 12:12 (luz: oscuridad) en el insectario de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Insecticidas

Los insecticidas empleados para las pruebas de susceptibilidad fueron dos piretroides: permetrina grado técnico, de 99.5% pureza (Chemservice, West Chester, PA, USA) y deltametrina grado técnico de 99.5% pureza (Chemservice, West Chester, PA, USA).

6.3 Antibióticos

Para modificar la microbiota de los mosquitos se utilizó dos antibióticos de amplio espectro: Gentamicina en solución de 50mg/mL en agua destilada (Gibco Life Technologies™) y penicilina estreptomicina [+] 10 000 unidades / ml de penicilina, [+] 10,000 µg / ml de estreptomicina (gibco Life Technologies™).

6.4 Tratamiento con antibióticos

Una vez completado el ciclo de desarrollo larvario de los mosquitos colectados, las pupas fueron transferidas a vasos de precipitado para la emergencia de adultos en jaulas entomológicas de 25x25x25 cm (Bug Dorm-1) previamente desinfectadas con

etanol al 70% a las cuales se les aplicó una solución de sacarosa al 10% estéril, 24 h post emergencia se seleccionaron lotes de entre 100-125 hembras para cada ensayo biológico con acceso solo a sacarosa al 10% (testigo) y/o el tratamiento con antibióticos en solución con sacarosa al 10%.

El tratamiento correspondiente se suministró durante 3 días consecutivos a partir del primer día de emergencia de las hembras, utilizando como vehículo sacarosa al 10%. Las concentraciones evaluadas fueron de 10 U/mL y 15 µg/mL de penicilina+ estreptomicina y gentamicina respectivamente, los tratamientos fueron retirados 24 h previas al bioensayo.

6.5 Bioensayos

Los bioensayos se realizaron de acuerdo al método de botellas del CDC (Brogdon y McAllister, 1998), 20 a 25 hembras de 4-5 d de edad fueron expuestas a la dosis diagnóstico recomendada en dicho protocolo (DD, permetrina: 15 µg/botella y deltametrina: 10µg/botella), además de un testigo sin insecticida.

Este proceso fue realizado por cuatro repeticiones. Los ejemplares que sobrevivieron al tiempo diagnóstico (TD, 30 min para ambos piretroides) registrándose la supervivencia para calcular el porcentaje de mortalidad para después ser transferidos a vasos de recuperación y almacenados a -80°C para los ensayos moleculares. Los ensayos biológicos se sometieron a condiciones controladas (temperatura media 27°C ± 2 °C y una humedad relativa de 75 % ± 5%).

6.6 Extracción de ADN

A partir de un pool de 100 individuos, las muestras se procesaron y analizaron con el Servicio ZymoBIOMICS® - Secuenciación metagenómica dirigida (Zymo Research, Irvine, CA). Se utilizó el kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA).

6.7 Preparación dirigida de la biblioteca

La secuenciación dirigida del gen del ARN ribosomal 16S bacteriano se realizó usando el kit de preparación de la biblioteca NGS Quick-16S™ (Zymo Research, Irvine, CA). Los cebadores 16S bacterianos amplificaron la región V1-V2 o V3-V4 del gen 16S rRNA. Estos primers fueron diseñados a medida por Zymo Research para proporcionar la mejor cobertura del gen 16S y mantener una alta sensibilidad. La biblioteca de secuenciación se preparó usando un proceso de preparación de biblioteca en el que las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores de PCR en tiempo real para controlar ciclos y, por lo tanto, evitar la formación de quimera de PCR límite. Los productos de PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia de qPCR y se combinaron en base a la molaridad igual. La biblioteca final agrupada se limpió con el Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA), luego se cuantificó con TapeStation® y Qubit®.

6.8 Secuenciación

La biblioteca final se secuenció en Illumina® MiSeq™ con un kit de reactivo v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con > 10% de PhiX spike-in.

6.9 Análisis de datos

Las secuencias únicas de amplicón se dedujeron de lecturas crudas utilizando el programa Dada2 (Callahan et al. 2016). Las secuencias quiméricas también se eliminaron el programa Dada2. La taxonomía se asignó mediante un script interno con nuestra propia base de datos 16S seleccionada como referencia. La taxonomía se asignó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1 con la base de datos Greengenes 16S como referencia. Se realizaron análisis de visualización de la composición, diversidad alfa y diversidad beta con Qiime v.1.9.1 (Caporaso et al. 2010). Si corresponde, la taxonomía que tiene una abundancia significativa entre los diferentes grupos fue identificada por LEfSe (Segata *et*

*al.*2011) usando configuraciones predeterminadas. Otros análisis como heatmaps, Taxa2SV_decomposer y PCoA gráficas se realizaron con scripts internos.

7. RESULTADOS

7.1 Bioensayos de modificación de microbiota y exposición a los insecticidas de *Ae. aegypti*

Se trabajó con una cepa silvestre de *Ae. aegypti* del estado de Yucatán. Se seleccionaron diferentes lotes de mosquitos para realizar los bioensayos. Los lotes alimentados únicamente con sacarosa 10% sin una exposición a insecticida fueron utilizados como control los cuales mostraron el 100% de supervivencia. Los lotes alimentados con sacarosa 10% expuestos al insecticida permetrina mostraron una supervivencia de 12.3% y para deltametrina de 5.8%. Lotes de mosquitos alimentados con sacarosa al 10% y tratados con antibióticos (penicilina/estreptomicina 10 U/mL y gentamicina 15 µg/mL expuestos a permetrina mostraron supervivencia del 6.3% y 4% respectivamente observándose un aumento de la mortalidad con respecto al grupo expuesto a insecticidas sin modificación de la microbiota. ($P < 0.05$). La supervivencia de los lotes expuestos a deltametrina tratados con penicilina/estreptomicina 10U/mL aumentaron un 2.2% con respecto a los no tratados, lo mismo se observó en el lote tratado con gentamicina 15 µg/mL aumentando 3.1% su porcentaje de supervivencia (Figura. 1).

7.2 Comunidades microbianas de *Ae. aegypti*

Un total de 148,300 secuencias crudas, fueron generadas a partir de mosquitos adultos de *Ae. aegypti*. Proteobacteria (92.4%) y Bacteroidetes (7.6%), fueron los *phylum* bacterianos más abundantes encontrado en mosquitos adultos de *Ae. aegypti* en sus condiciones normales alimentados con sacarosa al 10% (Grupo control). Brevemente, la diversidad bacteriana del control utilizado en este estudio estuvo predominantemente compuesta de las clases Gammaproteobacterias 91.6%, Flavobacteriia 7.63%, Betaproteobacteria 0.5% y Alphaproteobacteria 0.3%. Los órdenes presentes en este grupo fueron Enterobacteriales 77.7%, Pseudomonales 13.64%, Flavobacteriales 7.63%, Burkholderiales 0.5%, Aeronomadales 0.2%. En general, *Enterobacteraceae* 74.77%, *Pseudomonaceae* 13.16% y *Flavobacteraceae* 7.63% fueron las familias más abundantes. El género *Pantoea* 43.03% fue el más abundante siendo la especie *Pantoea agglomerans*

la que más predominó. Otras especies encontradas fueron: *Serratia marcescens* (17.25%), *Serratia marcescens-nemathodiphila* (17.15%), *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* (12.9%), *Elizabethkingia meningoseptica* (5.62%), *Chryseobacterium zeae* (2%) (Figura 2).

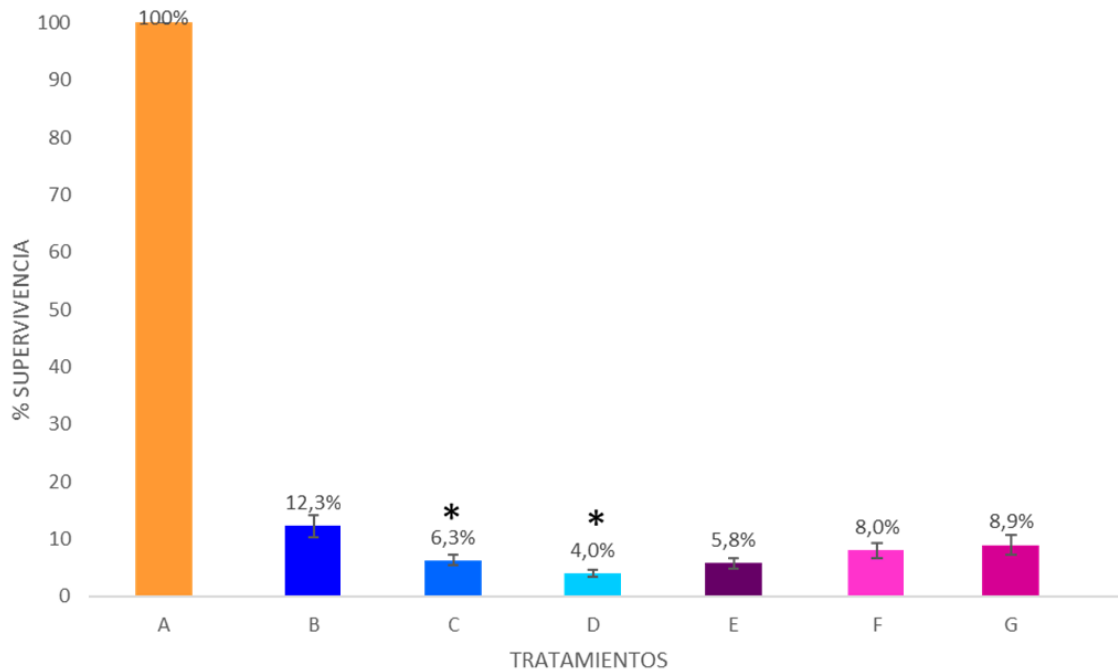


Figura 1. Porcentajes de supervivencia en una población de adultos de *A. aegypti* utilizando Bioensayo de botellas del CDC (* diferencia entre tratamientos con respecto a los grupos expuestos a insecticida $P < 0.05$). A: grupo control, B: expuestas a insecticida permetrina, C: modificación de microbioma con penicilina-estreptomicina expuestas a permetrina, D: modificación de microbioma con gentamicina expuesta a permetrina, E: expuestas a insecticida deltametrina, F: modificación de microbioma con penicilina-estreptomicina expuestas a deltametrina y G: modificación de microbioma con gentamicina expuesta a deltametrina.

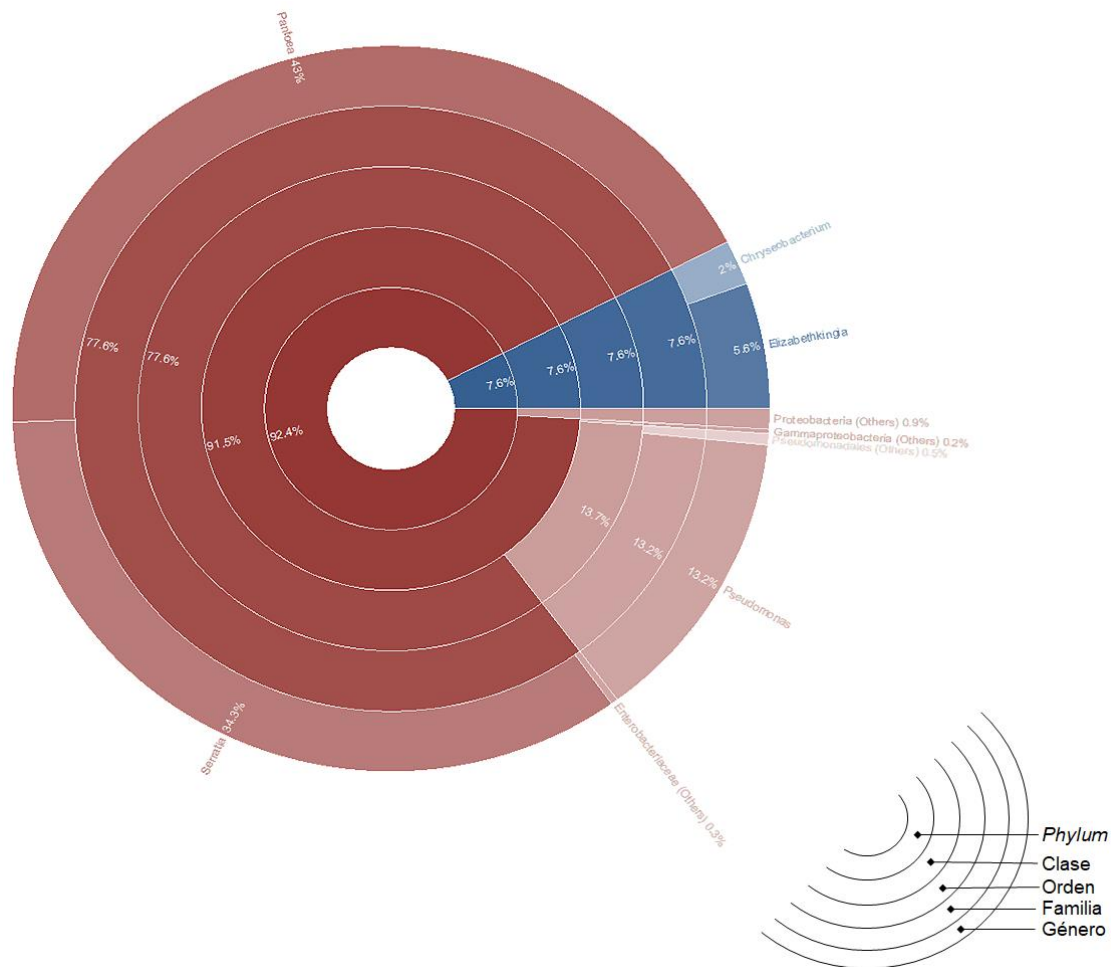


Figura 2. Abundancia taxonómica de mosquitos *Ae. aegypti* alimentados con sacarosa (grupo control).

Dentro de las comunidades bacterianas se determinaron especies patógenas para el ser humano residentes en *Ae. aegypti* como el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, *Burkholderia-Burkholderia-Paraburkholderia cepacia-contaminans-lata*, *Aeromonas dhakensis-hydrophila-taiwanensis*, *Klebsiella pneumoniae-quasipneumoniae*, *Pantoea agglomerans-eucrina*, *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha*, *Pseudomonas fluorescens-fragi*, *Pseudomonas fluorescens-synxantha*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens-nematodiphila* y *Shingomonas*

7.3 Supresión de la microbiota de *Ae. aegypti*

Cuando los lotes fueron tratados con penicilina/estreptomicina 10U/mL, su biota se reduce únicamente al *phylum* Proteobacteria (99.99%) mientras que los lotes tratados con gentamicina 15 µg/mL el 96.23% fue representado por el del *phylum* Proteobacteria

y un 3.77% Firmicutes. A su vez, se observó que los lotes tratados con penicilina/estreptomicina 10 U/mL mostraron la supresión de la familia *Enterobacteracea*, familia mayormente encontrada en los lotes control, predominando las familias *Comammonodacea* con 86% y *Pseudomonacea* con 13.2% específicamente el género *Delfia* (86.0 %) y *Pseudomonas* (13.36%). Los lotes expuestos con el gentamicina presentaron 95.2% de la familia *Alcaligenacea*, teniendo solo un 1.1% del total a la familia *Enterobacteracea*, exhibiendo el predominio de géneros no reportados en el lote control: *Bordetella* (95.2%), *Sthaphylococcus* (3.7%) y *Serratia* (1.1%). (Tabla 1).

7.4 Exposición a permetrina

Se determinaron las comunidades microbianas en la exposición a los insecticidas. el *phylum* más abundante fue Proteobacterias (74.1%) y Bacteroidetes (26%), comparando los mosquitos tratados con penicilina/estreptomicina expuestos a permetrina el mayor porcentaje lo representó el *phylum* Proteobacteria (97.1%) y Bacteroidetes (2.43%); mientras que los mosquitos tratados con gentamicina expuestos a permetrina solo se obtuvieron lecturas del *phylum* Proteobacterias (99.9%). Dentro del *phylum* Proteobacteria la clase mayormente representado fueron las Gammaproteobacteria para los 3 tratamientos expuestos al insecticida. Al igual la clase Flavobacteria fue la segunda más abundante (25.8%) en los mosquitos solo expuestos al insecticida; se observó una disminución de esta clase en los mosquitos tratados con penicilina/estreptomicina (-10.61 veces) y no se presencia de esta clase en los mosquitos tratados con gentamicina.

Tabla 1. Abundancia taxonómica después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en *Ae. aegypti*.

Control	Penicilina+ Estreptomicina	Gentamicina	
PHYLUM			
7.6			<i>Bacteroidetes</i>
		3.8	<i>Firmicutes</i>
92.4	99.9	96.2	<i>Proteobacteria</i>
	0.1		<i>Otros (<1%)</i>
CLASE			
7.6			<i>Flavobacteriia</i>
		3.8	<i>Bacilli</i>
0.5	86.1	95.2	<i>Betaproteobacteria</i>
91.6	13.7	1	<i>Gammaproteobacteria</i>
0.3	0.2		<i>Otros (<1%)</i>
ORDEN			
7.6			<i>Flavobacteriales</i>
		3.7	<i>Bacillales</i>
0.5	86	95.2	<i>Burkholderiales</i>
0.2			<i>Aeromonadales</i>
77.7	0.1	1.1	<i>Enterobacteriales</i>
13.6	13.2		<i>Pseudomonadales</i>
0.4	0.7		<i>Otros (<1%)</i>
FAMILIA			
7.6			<i>Flavobacteriaceae</i>
		3.7	<i>Staphylococcaceae</i>
	85.9		<i>Cormmaminadaceae</i>
0.2			<i>Aeromonadaceae</i>
77.7	0.1	1.1	<i>Enteribacteriaceae</i>
0.5			<i>Moraxellaceae</i>
13.6	13.2		<i>Pseudomonadaceae</i>
0.4	0.2	95.2	<i>Aeromonadaceae</i>
0.4	0.6		<i>Otros(<1%)</i>
GENERO			
2			<i>Chryseobacterium</i>
5.6			<i>Elizabethkingia</i>
		3.7	<i>Staphylococcus</i>
0.4		95.2	<i>Bordetella</i>
	85.9		<i>Delftia</i>
43			<i>Pantoea</i>
34.4	0.1	1.1	<i>Serratia</i>
13.2	13.2		<i>Pseudomonas</i>
1.4	0.8		<i>Otros (<1%)</i>
ESPECIE			
2			<i>Chryseobacterium zeae</i>
5.6			<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
		3.7	<i>Staphylococcus arlettae</i>
0.4		95.2	<i>Bordetella hinzii-petrii</i>
	85.9		<i>Delftia lacustris-tsuruhatensis</i>
43			<i>Pantoea agglomerans-eucrina</i>
17.2		0.6	<i>Serratia marcescens</i>
17.1	0.1	0.5	<i>Serratia marcescens-nematodiphila</i>
12.9	13.1		<i>Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha</i>
1.8	0.9		<i>Otros (<1%)</i>

Las familias mayormente encontradas fueron *Enterobacteraceae* (51.6%), *Flavobacteriaceae* (25.8%), *Pseudomonadaceae* (14.20%) y *Moraxellaceae* (7.6%) en los mosquitos solo expuestos al insecticida. Para los mosquitos tratados con penicilina/estreptomicina se observa un claro aumento de la familia *Pseudomonadaceae* (93.9%) y una disminución de la familia *Moraxellaceae* (2.4%). Los mosquitos tratados con gentamicina predominan 2 familias: *Enterobacteraceae* (57.9%) y *Aeromonadaceae* (41.7%). Los géneros que se pudieron encontrar en los mosquitos expuestos al insecticida fue *Pantoea* con un 38.4% de la población microbiana teniendo como única especie *Pantoea agglomerans*. En segundo lugar, encontramos a el género *Elizabethkingia* con la especie *Elizabethkingia meningoseptica* (22.63%). Otras especies encontradas fueron *Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha* 14.20 %, *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* 6.1%, *Serratia marcescens* 5.65 %, *Serratia marcescens-nemathodiphila* 5.57 %, *Chryseobacterium zeae* 3.04% *Klebsiella pneumoniae* 1.96%, *Acinetobacter johnsonii* 1.3%. En los mosquitos expuestos a permetrina tratados con penicilina-estreptomicina, la modificación de la microbiota nos permitió determinar a la especie *P. azotoformans-fluorescens-synxantha* en un 93,70%, *E. meningoseptica* 2,40% y *A. baumannii-calcoaceticus* 6.1%. En el caso de las poblaciones tratadas con gentamicina expuestas a permetrina su comunidad bacteriana estuvo compuesta por *Aeromonas dhakensis-hydrophila-taiwanensis* 41.7%, *Serratia marcescens* 28.8% y *Serratia marcescens-nematodiphila* 29.10%. Además, fueron encontradas otras especies no reportadas en los lotes no expuestos a insecticidas, sin embargo, la proporción fue <1% (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia a nivel especie después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en mosquitos tratados con antibióticos. A, mosquitos alimentados con sacarosa 10%; B, mosquitos alimentados con sacarosa 10% y expuestas a dosis diagnóstico de permetrina; C, mosquitos alimentados con sacarosa 10% tratados penicilina/estreptomicina 10 U/mL expuestos a dosis diagnóstico de permetrina; D, mosquitos alimentados con sacarosa 10% tratados gentamicina 15 µg/mL expuestos a dosis diagnóstico de permetrina.

Control	ANTIBIOTIC TREATMENT				
	A	B	C	D	
	-	+	+	+	Permetrine
	2.0	3.0			<i>Chryseobacterium zeae</i>
	5.6	22.8	2.4		<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
	0.2		0.1	41.7	<i>Aeromonas dhakensis-hydrophila-taiwanensis</i>
	0.3	2.0			<i>Klebsiella pneumoniae-quasipneumoniae</i>
	43.0	38.0	0.1		<i>Pantoea agglomerans-eucrina</i>
	17.2	5.6	0.2	28.8	<i>Serratia marcescens</i>
	17.1	5.6	0.2	29.1	<i>Serratia marcescens-nematodiphila</i>
	0.4	6.1	1.5		<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
		1.3	0.1		<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	12.9	14.2	93.7	0.2	<i>Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha</i>
	1.3	1.4	1.7	0.2	Others

7.5 Exposición a deltametrina

Para la determinación de las comunidades microbianas en mosquitos expuestos a deltametrina fueron dominadas por los *phylum* Proteobacteria (54.8%) y Bacteroidetes (38.9%). De igual manera los mosquitos tratados con penicilina-estreptomicina expuestos a deltametrina los filos más representativos fueron Proteobacteria (46.2%) y Bacteroidetes (53.8%). Caso contrario ocurrió con los tratados con gentamicina expuestos a deltametrina donde existe una disminución en los porcentajes de Bacteroidetes a solo un 5.7% y un aumento en el *phylum* Proteobacteria a 69% así como la presencia del *phylum* Firmicutes con 25.3% esto con respecto al control únicamente alimentado con sacarosa. La clase Gammaproteobacteria fue la más abundante para los tratamientos expuestos únicamente al insecticida con un 55%, de la misma manera esta clase estuvo presente al modificar la biota con penicilina-estreptomicina con un 39%, mientras que la clase Flavobacteria representó 39% y 54% respectivamente. Para el tratamiento de gentamicina la clase Betaproteobacteria se presentó con un 55.5% y las Gammaproteobacterias con 13.5%. Para este mismo tratamiento los *Bacillus* representaron un 25.3% y la clase Flavobacteria representó solo el 5.7%. Los órdenes más representativos en el tratamiento solo expuesto con insecticida y el tratado con penicilina-

estreptomicina fueron Flavobacteriales 39% y 54% seguido de Pseudomonadales 28% y 38% respectivamente. En el orden Enterobacteriales el tratamiento control solo con insecticida presentó una abundancia de 24% mientras que en los tratamientos de modificación de microbiota se observa un notable decremento de hasta un 1% en el tratamiento modificado con penicilina-estreptomicina en tanto que el tratamiento modificado con gentamicina no estuvo presente. La familia *Flavobacteriaceae* fue una familia mayormente representada en los tratamientos expuestos a deltametrina (39%) y el que fue tratado con el antibiótico penicilina-estreptomicina (54%), observándose un incremento de esta familia al momento de exponerse al insecticida comparado con los mosquitos controles que solo presentaron un 7.6% de esta familia. La especie perteneciente a esta familia encontrada en los mosquitos con insecticida y los tratados con penicilina-estreptomicina fue *Elizabethkingia meningoseptica*. Caso contrario se observó en los mosquitos tratados con gentamicina que en donde esta familia se vio disminuida hasta el 5.6% representada con la especie *Flavobacterium lindanitolerans*. La familia Staphylococcaceae solo fue encontrada en los mosquitos con biota modificada con gentamicina representando un 25.3% de la especie *Staphylococcus arlettae*. De igual manera en estos mosquitos la familia Alcaligenaceae se encontró en un 55% con la especie *Bordetella hinzii-petreei*, no presentándose en los otros tratamientos. La familia *Enterobacteriaceae* que componía el mayor porcentaje en los mosquitos no expuestos a insecticida (78%), al momento de exponerse al insecticida sufre un decremento a un 24% y al modificar la biota con los tratamientos de antibióticos se observa una disminución de la familia a 1% en los mosquitos tratados con penicilina estreptomicina y ausencia en los mosquitos tratados con gentamicina. Especies encontradas en mayor proporción como biota nativa de los mosquitos sin insecticida tal como *P. agglomerans-eucrina*, *S. marcescens* y el complejo *S. marcescens-nematodiphila* disminuyeron en los tratamientos expuestos a deltametrina y en los tratados con antibióticos prevalecieron en porcentajes <1%. Para el caso de la familia *Pseudomonadaceae* se observó un aumento de la concentración en los tratamientos expuestos a deltametrina y los modificados con penicilina-estreptomicina con respecto a los mosquitos no expuestos con la especie mayormente característica el complejo *Pseudomonas azotoformans-fluorescens*.

synxantha. Diferente a lo observado con los tratamientos modificados con gentamicina donde fue erradicada esta población (Tabla 3).

Tabla 3 . Abundancia a nivel especie después de la supresión de la microbiota mediante antibióticos en mosquitos tratados con antibióticos. A, mosquitos alimentados con sacarosa 10%; B, mosquitos alimentados con sacarosa 10% y expuestas a dosis diagnóstico de deltametrina; C, mosquitos alimentados con sacarosa 10% tratados penicilina/estreptomicina 10U/mL expuestos a dosis diagnóstico de deltametrina; D, mosquitos alimentados con sacarosa 10% tratados gentamicina 15 µg/mL expuestos a dosis diagnóstico de deltametrina.

Control	ANTIBIOTIC TREATMENT				
	A	B	C	D	
	-	+	+	+	Deltametrine
	2.0	0.3			<i>Chryseobacterium zeae</i>
	5.6	38.4	53.8		<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
				5.7	<i>Flavobacterium lindanitolerans</i>
		1.1			<i>Bacillus mojavenensis-subtilis-tequilensis</i>
				25.3	<i>Staphylococcus arlettae</i>
	0.4	0.2	6.7	55.2	<i>Bordetella hinzii-petriti</i>
	43.0	3.9	0.1		<i>Pantoea agglomerans-eucrina</i>
	17.2	11.4	0.6		<i>Serratia marcescens</i>
	17.1	7.0	0.4		<i>Serratia marcescens-nematodiphila</i>
	0.4	1.3			<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
	12.9	26.1	38.0		<i>Pseudomonas azotoformans-fluorescens-synxantha</i>
				13.4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	1.4	10.3	0.4	0.4	<i>Others</i>

8. DISCUSIÓN

Los insectos son el grupo de organismos más amplio con una gran diversidad de estilos de vida, lo cual depende directamente de las asociaciones que estos tienen con los microorganismos (Douglas, 2014; Guégan, et al. 2018). Las adaptaciones de los mosquitos a las presiones selectivas han obligado a determinar nuevas formas de abordaje para su control, a pesar de la información existente pocos estudios relacionan la respuesta a los insecticidas con la microbiota, es por ello que en este estudio realizamos la descripción por primera vez de la microbiota de una población de *Ae. aegypti* del sur de México con técnicas de secuenciación, así como la caracterización de bacterias clave en respuesta a 2 insecticidas piretroides.

Previamente se han realizado estudios determinando la microbiota de mosquitos en diferentes regiones que han permitido conocer la diversidad microbiana de estas especies. En nuestro estudio la microbiota natural de la población de *Ae. aegypti* (control) determinada fue predominantemente dominada por los *phylum* Proteobacteria y Bacteroidetes, coincidiendo con lo reportado en poblaciones de mosquitos en otras regiones como las encontradas en *Ae. aegypti*, de poblaciones de áreas endémicas de Panamá, en donde se encontraron la predominancia de los *phylum* Proteobacteria y Firmicutes (Ramirez et al. 2012) y con lo encontrado en intestino de *An. gambiae* que predominantemente estuvo dominado por Proteobacteria and Bacteroidetes (Wang, Y. et al. 2011). Las poblaciones de nuestro grupo control las especies predominantes fueron *P. agglomerans-eucrina*, *S. marcescens-nematodiphila*, *P. azotoformans-fluorescens-synxantha* y *E. meningoseptica*. Con anterioridad estos mismos géneros de bacterias han sido aislados en otras especies de mosquitos como *A. gambiae* y *A. funestus* de Kenia y Mali, aislándose principalmente las especies *E. coli* y *P. agglomerans* (Straif et al. 1998). Similarmente en mosquitos de *Ae. aegypti* (Rockefeller) fueron aisladas los géneros *Bacillus*, *Elizabethkingia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* y *Sphingomonas* (Terenius et al. 2012). En Brasil, se detectaron en poblaciones de *Ae. aegypti* los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Aeromonas* spp. como más abundantes (David et al. 2016). Similarmente en *Ae. aegypti* se detectó *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Serratia* como los géneros más predominantes (Gusmão, D.

S et al. 2010). De la misma manera en especies de *Anopheles* provenientes de Vietnam, se encontró como componente principal de la microbiota intestinal a *Acinetobacter* spp. (Ngo et al. 2016). Tchioffo *et al.* detectó en diferentes poblaciones de *Anopheles* como biota central a *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tchioffo et al. 2016). Como microbiota central fue identificada *Acinetobacter junii*, *Ac. calcoaceticus*, *Aeromonas culicicola*, *Bacillus thuringiensis*, *Microbacterium oxydans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* en intestino de *Culex quinquefasciatus* (Pidiyar et al. 2004).

La especie más representativa en nuestro grupo control fue *P. agglomerans* que se caracteriza por ser una enterobacteria patógena en seres humanos considerada como un microorganismo oportunista. Esta ha sido aislada de diversas fuentes ecológicas como plantas, frutas y vegetales, también encontrada en heces humanas y de animales incluyendo como simbioses en insectos (Segado Arenas et al. 2012; De Maayer *et al.* 2017). Se ha asociado con la producción de fenoles en *Schistocerca gregaria* como compuestos antioxidantes (Dillon y Charnley, 1995). Se ha informado en la mosca del gusano arándano formando una asociación mutualista realizando procesos esenciales del ciclo de nitrógeno (Potrikus y Breznak, 1977; Walteson y Stavrinides, 2015). De la misma forma en el mosquito la bacteria *P. agglomerans* participa en la fijación de nitrógeno creando un ambiente rico en nitrógeno ideal para el desarrollo de huevos y larvas (MacCollom et al. 2009).

Previamente se ha conocido que los mosquitos adultos pueden contener una diversidad bacteriana concentrada principalmente en bacterias aerobias y anaerobias facultativas gramnegativas (Coon et al. 2014; Coon et al. 2016). Las poblaciones de bacterias difieren debido a el hábitat en el que interaccionan ya que depende de la alimentación, a través de plantas, fuente de azúcar o mediante la sangre en mosquitos hembras (Guégan et al. 2018). Se sabe que muchas de las asociaciones relacionadas entre las comunidades bacterianas de un insecto son mutualistas en donde el huésped proporciona a las bacterias nutrientes y hábitat, teniendo selectividad por las condiciones fisicoquímicas presentes en el intestino del huésped (e.g. pH alcalino, potencial redoxs,

nivel de oxígeno debajo de 5%, etc.; Dada et al. 2014). Se ha reportado que muchas de las bacterias gramnegativas son frecuentemente encontradas en el intestino medio de insectos vectores influyendo en el crecimiento diferencial contribuyendo a la modulación de la competencia vectorial (Azambuja et al. 2005). En mosquitos las bacterias del phylum Proteobacteria, especialmente la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales son los componentes principales del microbioma del intestino medio, pueden tolerar el estrés redox de la digestión de sangre (Jupatanakul et al. 2014). Además, en reportes señalan que la modificación de la microbiota intestinal con antibioticos como carbenicilina y tetraciclina reduce la abundancia de bacterias cultivables impactando en funciones como la rotura de la sangre y la ovoposición (Minard et al. 2013). Algunos estudios sugieren el rol potencial de las bacterias como especies de *Enterobacter* y *Serratia* cuyo papel dentro del mosquito es la actividad hemolítica para el procesamiento de la sangre (Minard et al. 2013). Teniendo como antecedente que las enterobacterias poseen un papel importante dentro de la fisiología de los mosquitos se modificó la microbiota de nuestra población reduciendo especies importantes de enterobacterias para ver su impacto dentro de la respuesta a los insecticidas. Al enfrentar nuestras poblaciones de *Ae. aegypti* modificadas con penicilina-estreptomomicina y enfrentadas al insecticida permetrina encontramos la disminución de la supervivencia 6% en comparación con el control y las poblaciones modificadas con el antibiótico gentamicina disminuyeron 8% en comparación con el control. La microbiota presente dentro de las poblaciones modificadas con penicilina-estreptomomicina fue determinada en > del 90% por la especie *P. azotoformans-fluorescens-synxantha*, mientras que en los tratamientos con gentamicina *A. dhakensis-hydrophila-taiwanensis* y *S. marcescens-nematodiphila* 29.10%. Las cepas adscritas al género *Pseudomonas* son bacterias gramnegativas, ubicuas, caracterizadas por necesidades nutricionales primarias y presentes en diversos entornos (suelo, material orgánico en descomposición, polvo atmosférico, vegetación y agua), con una amplia gama de plantas y animales (Andreani et al. 2015). Este género ha sido encontrado como parte de la comunidad bacteriana en insectos, algunas investigaciones señalan la efectividad toxica de *P. aeruginosa* en diferentes especies de larvas de mosquitos del género *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y *Culiseta*. En experimentos *in vivo* con cultivos de *P. fluorescens* se han encontrado efectividad contra pupas de 3 especies de mosquitos vectores *An.*

stephensi, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* (Prabakaran et al. 2009). De la misma manera Nabar, BM y Lokegaonkar, (2015) señalan el poder larvicida de metabolitos extraídos de especies de *Pseudomonas* spp. y Sadanandane y colaboradores en el 2003 señalan que la especie *P. fluorescens* posee metabolitos activos contra las larvas y pupas de mosquitos de *Cx. quinquefasciatus* (Sadanndane et al. 2003; Brammacharry y Paily, 2012). Así sucesivamente con la modificación de la microbiota con el antibiótico gentamicina la presencia del complejo *A. dhakensis-hydrophila-taiwanensis*. Este género de bacterias gramnegativas presente en un gran número de ambientes (acuáticos, peces, alimentos, mascotas domesticadas, especies de invertebrados, aves, garrapatas e insectos y suelos naturales) (Figueras et al. 2005; Janda y Abbott, 2010), estos han sido aislados de intestinos de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* (Pidiyar et al. 2002; Pidiyar et al. 2004). Estos géneros al igual que *Pseudomonas* spp. han sido asociados a la degradación de insecticidas piretroides (Lee et al. 2004). Del mismo modo se ha reportado a la especie *A. hydrophila* la presencia de enzimas quitinolíticas con actividad contra *Cx. quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio (Halder et al. 2012). Como se pudo observar en nuestros resultados al modificar la microbiota se eliminaron enterobacterias que pueden tener un rol importante en el mantenimiento de la respuesta a los insecticidas, quedando bacterias que previamente ya se ha reportado que debido a sus metabolitos producidos pueden comprometer el funcionamiento fisiológico del mosco y por eso se observa una disminución de la sobrevivencia de los moscos.

Contrario a lo esperado, la respuesta en la exposición a deltametrina fue diferente a lo observado en el grupo de permetrina. Existe un incremento a la sobrevivencia del mosquito durante la exposición a deltametrina, 2.2 % tratados con penicilina-estreptomicina y 3.1% tratados con gentamicina. La microbiota en las poblaciones expuestas a deltametrina tratada con el antibiótico penicilina-estreptomicina las especies predominante fueron *E. meningoseptica* y *P. azotoformans-fluorescens-synxantha* mientras que las expuestas a gentamicina *B. hinzii-petrii* y *S. arletta*. En el caso de la bacteria *E. meningoseptica* que fue la más abundante en la modificación con penicilina-estreptomicina, son bacilos gramnegativos, no móviles, no formadoras de esporas ubicuo en la naturaleza (Kim et al. 2005). Estos miembros de este género se encuentran en

hábitats húmedos y entornos hospitalarios, en particular en suministros de agua (Kämpfer et al. 2011). En mosquitos, se ha reportado que esta bacteria es capaz de modular los efectos anti-*Plasmodium*, prolongando así la vida útil del vector del mosquito infectado (Akhouayri, 2013). Aunado a esto, ha sido repetidamente detectada en condiciones de laboratorio siendo parte importante de la funcionalidad en el mosquito (Wang et al. 2011). Se sabe que la especie *E. anophelisis* es una especie dominante en la microbiota intestinal del mosquito *A. gambiae* (Kämpfer et al. 2011; Akhouayri, 2013; Gusmão et al. 2010; Rani et al. 2009, Boissière et al. 2012) y *E. meningoseptica* ha sido encontrada en *Cx. quinquefasciatus* (Terenius et al. 2012). Igualmente, el género *Elizabethkingia* fue detectado en 68% en poblaciones de mosquito colectadas en Camerún (Chen et al. 2015). En el caso de la especie *Bordetella* sp. que fue la bacteria más abundante en la modificación con gentamicina; esta se puede encontrar en varios ambientes acuáticos y fuentes ambientales terrestres, asociándose también a plantas (Shamim et al. 2019). El género *Bordetella* ha sido aislado en mosquitos adultos de la especie *A. stephensi* (Chavshin, 2012). *B. hinzii* es comúnmente aislada de tractos respiratorios de pájaros siendo perjudicial personas inmunocomprometidas (Weiss, 2006). A pesar de que estas especies no son comunes dentro de las microbiotas en mosquitos, puede encontrarse en bajas cantidades dentro del ecosistema intestinal o en tejidos dentro del mosco cumpliendo con una conexión ecológica intrigante con el comportamiento y la protección frente a condiciones adversas (Kukutla et al. 2013). Estudios recientes han demostrado el papel de las bacterias simbióticas en procesos de desintoxicación (Itoh et al. 2018). Esto se ha observado en artrópodos con el fenitrotión aplicado en campos agrícolas, el cuál presenta degradación por bacterias como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Burkholderia* (Kikuchi et al. 2012). De la misma forma se ha encontrado que *Bacillus cereus*, aislado del intestino de la polilla *P. xilostella* presenta una alta degradación del pesticida indoxacarb (Ramya et al. 2016), a su vez *Enterobacter asburiae* y *P. agglomerans* fueron encontrados en la degradan el acefato (b. Ramya et al. 2016). Asimismo, la especie *Citrobacter* fue aislada de intestinos de *B. dorsalis*, capaz de hidrolizar triclorfon (McFall-Ngai et al. 2013). Últimamente en un estudio se determinó los efectos de los insecticidas piretroides sobre la microbiota de *An. albimanus*, encontrándose diferencias con respecto a los mosquitos no expuestos a piretroides determinando a *Klebsiella*,

Pantoea and *Asia* como especies clave en la resistencia a piretroides *An. albimanus* (Dada et al. 2019). En nuestro estudio no encontramos especies sin antecedentes para el metabolismo de deltametrina sin embargo pudimos observar en nuestros resultados en la exposición a deltametrina el aumento de la resistencia que puede deberse a la participación de estas bacterias durante el proceso de desintoxicación. Es de suma importancia en un futuro poder estudiar la participación de ellas dentro de los mecanismos de desintoxicación en mosquitos ya que la información que se tiene a la fecha es limitada.

10. CONCLUSION

1. Se caracterizó el microbioma en la población silvestre de *Ae. aegypti* teniendo como especies abundantes a *E. meningoseptica*, *P. agglomerans-eucrini*, *Serratia marseecens* y *P. azotoformans*.
2. El porcentaje de mortalidad en mosquitos expuestos a permetrina aumenta en poblaciones con microbiota modificada presentado como las especies más representativas de bacterias a *Aeromonas dhakensis-hydrophila-taiwanensis*, *Serratia marcescens* y *Serratia marcescens-nematodiphila* y *Pseudomonas sp.*
3. No hubo influencia de la microbiota en los mosquitos expuestos a deltametrina presentándose como las especies más representativas a bacterias como *Elizabethkingia meningoseptica*, *Pseudomonas sp.*, *Bordetella hinzii-petrii*, *Staphylococcus arlettae* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

10. REFERENCIAS

- Abdul-Ghani, R., Al-Mekhlafi, A.M., and Alabsi, M.S. (2012). Microbial control of malaria: biological warfare against the parasite and its vector. *Acta Tropica*, 121(2), 71-84. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.001
- Akhouayri, I. G., Habtewold, T., & Christophides, G. K. (2013). Melanotic pathology and vertical transmission of the gut commensal *Elizabethkingia meningoseptica* in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 8(10), e77619.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., & Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature genetics*, 32(3), 402-407.
- Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R. & Cardazzo, B. (2015). Reprint of 'Tracking the blue: a MLST approach to characterize the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food microbiology*, 45, 148-158.
- Araújo, H. R., Carvalho, D. O., Ioshino, R. S., Costa-da-Silva, A. L., & Capurro, M. L. (2015). *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*, 6(2), 576-594.
- Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology*, 21(12), 568-572.
- Birmingham, M. Países de las Américas se preparan frente al dengue, Chikungunya y Zika. "Jornadas de arbovirosis: dengue, chikungunya y zika. Preparación y respuesta de los países de Cono Sur" OPS/OMS, Buenos Aires, noviembre de 2015.

- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E. & Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002742
- Brammacharry, U., & Paily, K. (2012). Chitinase like activity of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Migula on immature stages of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Microbiology Research*, 6(11), 2718-2726.
- Brogdon, W. G., & McAllister, J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(2), 159-164.
- Calvitti, M., Moretti, R., Skidmore, A. R., & Dobson, S. L. (2012). Wolbachia strain w Pip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors*, 5(1), 254.
- Chavshin, A. R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Pourmand, M. R., Raeisi, A., Enayati, A. A. & Ghoorchian, S. (2012). Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Tropica*, 121(2), 129-13.
- Chen, S., Bagdasarian, M., & Walker, E. D. (2015). *Elizabethkingia anophelis*: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(6), 2233-2243.
- Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 9(1), 375.
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology*, 23(11), 2727-2739.

- Dada, N., Lol, J. C., Benedict, A. C., Lopez, F., Sheth, M., Dzuris, N., ... & Lenhart, A. (2019). Pyrethroid exposure alters *Anopheles albimanus* microbiota and resistant mosquitoes harbor more insecticide-metabolizing bacteria. *bioRxiv*, 537480.
- David, M. R., Santos, L. M. B. D., Vicente, A. C. P., & Maciel-de-Freitas, R. (2016). Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(9), 577-587.
- De Maayer, P., Aliyu, H., Vikram, S., Blom, J., Duffy, B., Cowan, D. A. & Coutinho, T. A. (2017). Phylogenomic, pan-genomic, pathogenomic and evolutionary genomic insights into the agronomically relevant enterobacteria *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1755.
- Dennison, N. J., Jupatanakul, N., and Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 3, 6-13. doi: 10.1016/j.cois.2014.07.004
- de O Gaio, A., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F., & Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.). *Parasites & Vectors*, 4(1), 105.
- Dillon, R. J., & Charnley, A. K. (1995). Chemical barriers to gut infection in the desert locust: in vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(1), 72-75.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, 1-17.

- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual review of entomology, 43(1), 17-37.
- Douglas, A. E. (2014). The molecular basis of bacterial–insect symbiosis. Journal of molecular
- Du, J., Ngo, H. T., Won, K., Kim, K. Y., Jin, F. X., & Yi, T. H. (2015). *Chryseobacterium solani* sp. nov., isolated from field-grown eggplant rhizosphere soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65(8), 2372-2377.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. FEMS microbiology reviews, 37(5), 699-735.
- Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(27), 11002-11007.
- Figueras, M. J., Suarez-Franquet, A., Chacon, M. R., Soler, L., Navarro, M., Alejandre, C. & Guarro, J. (2005). First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. Appl. Environ. Microbiol., 71(1), 538-541.
- Fujiwara, G. M., Annies, V., de Oliveira, C. F., Lara, R. A., Gabriel, M. M., Betim, F. C. & Miguel, M. D. (2017). Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 139, 238-244.
- Gimonneau, G., Tchioffo, M. T., Abate, L., Boissière, A., Awono-Ambéné, P. H., Nsango, S. E. & Morlais, I. (2014). Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. Infection, Genetics and Evolution, 28, 715-724.

- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Potier, P., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Bacci Jr, M., Berbert-Molina, M. A., & Lemos, F. J. A. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta tropica*, 115(3), 275-281.
- Halder, S. K., Maity, C., Jana, A., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2012). Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. *BioControl*, 57(3), 441-449.
- Hughes, G. L., Dodson, B. L., Johnson, R. M., Murdock, C. C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y. & Sakamoto, J. M. (2014). Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12498-12503.
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., & Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural product reports*, 35(5), 434-454.
- Iturbe Ormaetxe, I., Walker, T., & LO'Neill, S. (2011). *Wolbachia* and the biological control of mosquito borne disease. *EMBO reports*, 12(6), 508-518.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4294-4313.

- Kämpfer, P., Matthews, H., Glaeser, S. P., Martin, K., Lodders, N., & Faye, I. (2011). *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61(11), 2670-2675.
- Kantor, I. N. (2016). Dengue, zika y chikungunya. Medicina (Buenos Aires), 76(2), 93-97.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(22), 8618-8622.
- Kim, K. K., Kim, M. K., Lim, J. H., Park, H. Y., & Lee, S. T. (2005). Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55(3), 1287-1293.
- Kukutla, P., Lindberg, B. G., Pei, D., Rayl, M., Yu, W., Steritz, M., & Xu, J. (2013). Draft genome sequences of *Elizabethkingia anophelis* strains R26T and Ag1 from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Genome Announc., 1(6), e01030-13.
- Lee, S., Gan, J., Kim, J. S., Kabashima, J. N., & Crowley, D. E. (2004). Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. Environmental toxicology and chemistry, 23(1), 1-6.
- Lol, J. C., Castellanos, M. E., Liebman, K. A., Lenhart, A., Pennington, P. M., & Padilla, N. R. (2013). Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. Parasites & vectors, 6(1), 268.
- Liu, N., Xu, Q., Zhu, F., & Zhang, L. E. E. (2006). Pyrethroid resistance in mosquitoes. *Insect Science*, 13(3), 159-166.

- MacCollom, G. B., Lauzon, C. R., Sjogren, R. E., Meyer, W. L., & Olday, F. (2009). Association and attraction of blueberry maggot fly Curran (Diptera: Tephritidae) to *Pantoea* (Enterobacter) *agglomerans*. *Environmental entomology*, 38(1), 116-120.
- Marriel, N. B., Tomé, H. V. V., Guedes, R. C. N., & Martins, G. F. (2016). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta tropica*, 158, 88-96.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., & Hentschel, U. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3229-3236.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910), 141-144.
- Meyer, M., & Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5448.
- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6(1), 146.
- Mondiale de la Santé, O., & World Health Organization. (2017). *Weekly Epidemiological Record*, vol. 92, 28. 393-404.
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... & Hugo, L. E. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278.

- Musso, D., & Gubler, D. J. (2015). Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet*, 386(9990), 243-244.
- Nabar, B. M., & Lokegaonkar, S. (2015). Larvicidal activity of microbial metabolites extracted from extremophiles against vector mosquitoes. *Int J Mosq Res*, 2, 161-165.
- Ngo, C. T., Romano-Bertrand, S., Manguin, S., & Jumas-Bilak, E. (2016). Diversity of the bacterial microbiota of *Anopheles* mosquitoes from Binh Phuoc Province, Vietnam. *Frontiers in microbiology*, 7, 2005.
- Nkya, T. E., Akhouayri, I., Kisinza, W., & David, J. P. (2013). Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(4), 407-416.
- Nunez-Valdez, M. E., Calderón, M. A., Aranda, E., Hernández, L., Ramírez-Gama, R. M., Lina, L., & Villalobos, F. J. (2008). Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3), 802-810.
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803-1807.
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., & Aksoy, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and environmental microbiology*, 74(19), 5965-5974.
- Pidiyar, V. J., Jangid, K., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2004). Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(6), 597-603.

- Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N. B., Patole, M., & Shouche, Y. S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52(5), 1723-1728.
- Potrikus, C. J., & Breznak, J. A. (1977). Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. Applied and environmental microbiology, 33(2), 392-399.
- Prabakaran, G., Hoti, S. L., & Paily, K. P. (2009). Development of cost-effective medium for the large-scale production of a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* Migula. Biological Control, 48(3), 264-266.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS neglected tropical diseases, 6(3), e1561.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS neglected tropical diseases, 6(3), e1561.
- Ramya, S. L., Venkatesan, T., Murthy, K. S., Jalali, S. K., & Varghese, A. (2016). Degradation of acephate by *Enterobacter asburiae*, *Bacillus cereus* and *Pantoea agglomerans* isolated from diamondback moth *Plutella xylostella* (L), a pest of cruciferous crops. Journal of environmental biology, 37(4), 611.
- Ramya, S. L., Venkatesan, T., Srinivasa Murthy, K., Jalali, S. K., & Verghese, A. (2016). Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. Brazilian Journal of Microbiology, 47(2), 327-336.

- Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T., & Bhatnagar, R. K. (2009). Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC microbiology*, 9(1), 96.
- Ranson, H., & Lissenden, N. (2016). Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends in parasitology*, 32(3), 187-196.
- Ricci, I., Damiani, C., Capone, A., DeFreece, C., Rossi, P., & Favia, G. (2012). Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Current opinion in microbiology*, 15(3), 278-284.
- Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 189-201.
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., Milá, L. H., Calvo, E., Díaz, C., & Alain Soca, L. (1999). Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(2), 83-88.
- Sadanandane, C., Reddy, C. M. R., Prabakaran, G., & Balaraman, K. (2003). Field evaluation of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Culex quinquefasciatus* larvae and pupae. *Acta tropica*, 87(3), 341-343.
- Saavedra-Rodriguez, K., Beaty, M., Lozano-Fuentes, S., Denham, S., Garcia-Rejon, J., Reyes-Solis, G., ... & Black IV, W. C. (2015). Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan State, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(1), 201.
- Segado Arenas, A., Alonso Ojembarrena, A., Lubián López, S. P., & García-Tapia, A. M. (2012). *Pantoea agglomerans*: ¿un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales? *Arch Argent Pediatr*, 110(3), 000-000.

- Shamim, G., Sharma, K. K., & Ramani, R. (2019). Isolation and identification of culturable bacteria from honeydew of Indian lac insect, *Kerria lacca* (Kerr) (Hemiptera: Tachardiidae). *Meta Gene*, 19, 10-14.
- Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide biochemistry and physiology*, 133, 1-12.
- Straif, S. C., Mbogo, C. N., Toure, A. M., Walker, E. D., Kaufman, M., Toure, Y. T., & Beier, J. C. (1998). Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *Journal of medical entomology*, 35(3), 222-226.
- Tchioffo, M. T., Boissière, A., Abate, L., Nsango, S. E., Bayibéki, A. N., Awono-Ambéné, P. H., & Morlais, I. (2016). Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Frontiers in microbiology*, 6, 1500.
- Terenius, O., Lindh, J. M., Eriksson-Gonzales, K., Bussière, L., Laugen, A. T., Bergquist, H., & Faye, I. (2012). Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 556-565.
- Tringe, S. G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., & Bork, P. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721), 554-557.
- Villamil-Gómez, W. E., González-Camargo, O., Rodríguez-Ayubi, J., Zapata-Serpa, D., & Rodríguez-Morales, A. J. (2016). Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *Journal of infection and public health*, 9(5), 684-686.
- Walterson, A. M., & Stavrínides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968-984.

- Wang, Y., Gilbreath III, T. M., Kukutla, P., Yan, G., & Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. PloS one, 6(9), e24767.
- Weiss, A. (2006). The genus *Bordetella*. The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, 648-674.
- Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. Trends in parasitology, 27(11), 514-522.
- WHO (2016). Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. Programme GM, editor. Geneva: World Health Organization.
- Zaim, M., & Guillet, P. (2002). Alternative insecticides: an urgent need. Trends in parasitology, 18(4), 161-163.

RESUMEN BIOGRAFICO

Armando Javier Jimenez Camacho

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con acentuación en Entomología Médica

Tesis: EVALUACIÓN DE LA SUCEPTIBILIDAD A LOS INSECTICIDAS
PERMETRINA Y DELTAMETRINA, EN *Aedes aegypti* MEDIANTE LA
MODIFICACIÓN DEL MICROBIOMA

Campo de Estudio: Entomología Medica

Datos Personales: Nacido en Saltillo, Coahulia, México el 17 de octubre 1976, hijo de
Jorge Jimenez Flores y María de la Luz Camacho Contreras.

Educación: Egresado de la licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias
Biologicas de la UANL.